

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup>:</b><br><b>C12N 5/08, C12Q 1/06 // A61K 35/14</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 95/06112</b><br><b>(43) International Publication Date:</b> <b>2 March 1995 (02.03.95)</b>  |
| <b>(21) International Application Number:</b> <b>PCT/US94/09622</b><br><b>(22) International Filing Date:</b> <b>23 August 1994 (23.08.94)</b><br><br><b>(30) Priority Data:</b><br><b>08/110,277</b> <b>23 August 1993 (23.08.93)</b> <b>US</b><br><br><b>(71) Applicant:</b> <b>BAXTER INTERNATIONAL INC. [US/US]; One Baxter Parkway, Dearfield, IL 60015-4633 (US).</b><br><br><b>(72) Inventors:</b> <b>SMITH, Stephen, L.; 510 East Mayfair Road, Arlington Heights, IL 60005 (US). QIAO, Xiaoying; 1401 Grand Avenue #4, Waukegan, IL 60085 (US). MACIUKAS, Susan, M.; 924 Everett Street, El Cerrito, CA 94530 (US). BENDER, James, G.; 565 White Birch Road, Lindenhurst, IL 60046 (US). VAN EPPS, Dennis, E.; 197 River Drive, Cary, IL 60013 (US). LOUDOVARIS, Maureen, F.; 114 Mainsail Drive, Grayslake, IL 60030 (US).</b><br><br><b>(74) Agents:</b> <b>CONDINO, Debra, D. et al.; Baxter Healthcare Corporation, P.O. Box 15210, Irvine, CA 92713-5210 (US).</b>  |           | <b>(81) Designated States:</b> <b>AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b><br><br><b>Published</b><br><i>With international search report.</i> |
| <b>(54) Title:</b> <b><i>IN VITRO</i> GROWTH OF NEUTROPHIL AND MEGAKARYOCYTE PRECURSORS IN SERUM-FREE MEDIA</b>   |           |   |
| <b>(57) Abstract</b><br><p>The invention provides serum-free, animal protein-free media formulations to be used in conjunction with hematopoietic growth factors for the <i>in vitro</i> growth of human neutrophil and megakaryocyte precursors. The medium is comprised of a base medium, corticosteroid, transferrin, insulin, cholesterol, ethanolamine, and human albumin. The invention also provides methods for preparing serum-free, animal protein-free suspensions of human hematopoietic precursor cells wherein the cellular component comprises at least about 16 % neutrophil precursors and at least about 1 % megakaryocyte precursors. Serum-free, animal protein-free suspensions of human hematopoietic cells are provided wherein the cellular component comprises at least about 30 %, preferably greater than 60 % neutrophil precursors. The neutrophil precursors are comprised of blast cells, promyelocytes, neutrophilic myelocytes, and neutrophilic metamyelocytes. Also provided are serum-free, animal protein-free cell suspensions wherein the cellular component comprises at least about 3 %, preferably greater than 8 % megakaryocyte precursors. Also provided are serum-free, animal-protein free cell suspensions wherein the cellular component comprises colony-forming units and cluster-forming units.</p> |           |   |

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-505462

(43) 公表日 平成9年(1997)6月3日

| (51) Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号 | 序内整理番号  | F I           |  |   |
|---------------------------|------|---------|---------------|--|---|
| C 1 2 N 5/06              |      | 9281-4B | C 1 2 N 5/00  |  | E |
| C 1 2 Q 1/06              |      | 7823-4B | C 1 2 Q 1/06  |  |   |
| // A 6 1 K 35/14          |      | 9283-4C | A 6 1 K 35/14 |  | Z |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁)

(21) 出願番号 特願平7-507759  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)8月23日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)2月19日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/09622  
 (87) 国際公開番号 WO95/06112  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)3月2日  
 (31) 優先権主張番号 08/110,277  
 (32) 優先日 1993年8月23日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 バクスター、インターナショナル、インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国60015-4633イリノイ、デイヤフィールド、バクスターパークウェイ1  
 (72) 発明者 スミス、スティーブン、エル  
 アメリカ合衆国60006イリノイ、アーリントンハイツ、イーストメイフェアロード510  
 (74) 代理人 弁理士 赤岡 達夫 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無血清培養地内での好中球前駆細胞及び巨核球前駆細胞の試験管内増殖

## (57) 【要約】

本発明はヒトの好中球前駆細胞及び巨核球前駆細胞の *in vitro* における増殖のために造血増殖因子と共に用いられるための無血清、動物蛋白質不含の培養組成を提供する。該培養地は基本培養地、コルチコステロイド、トランスフェリン、インシュリン、コレステロール、エタノールアミン、及びヒトアルブミンを含む。本発明は同様に当該細胞成分が少なくとも約16%の好中球前駆細胞と少なくとも約1%の巨核球前駆細胞を含むヒトの造血前駆細胞の無血清、動物蛋白質不含の懸濁液を調製する方法を提供する。ヒトの造血細胞の無血清、動物蛋白質不含の懸濁液は、該細胞成分が少なくとも約30%、好ましくは60%より多く好中球前駆細胞を含むように調製される。該好中球前駆細胞は芽球、前骨髄球、好中性骨髄球、及び好中性後骨髄球からなる。同様に得られるのは、当該細胞成分が少なくとも約3%、好ましくは8%より多く巨核球前駆細胞を含む無血清、動物蛋白質不含の細胞懸濁液である。同様に得られるのは、該細胞成分はコロニー形成単位及びクラスター形成単位を含む、無血清、動物蛋白質不含の細胞懸濁液である。

(3)

エタノールアミン, 50乃至200  $\mu\text{M}$

ヒトアルブミン, 0.1乃至25  $\text{mg}/\text{ml}$

HEPES 緩衝剤, 10乃至25  $\text{mM}$

を含むものである、無血清培地。

9. 請求項8の無血清培地であって、

ヒドロコルチゾン, 200  $\text{ng}/\text{ml}$

コレステロール, 0.05  $\text{mg}/\text{ml}$

トリグリセリド, 0.017  $\text{mg}/\text{ml}$

トランスフェリン, 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$

インシュリン, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$

$\alpha$ -モノチオグリセロール, 216  $\text{ng}/\text{ml}$

$\beta$ -メルカプトエタノール,  $5 \times 10^{-5}$   $\text{M}$

エタノールアミン, 100  $\mu\text{M}$

ヒトアルブミン, 10  $\text{mg}/\text{ml}$

HEPES 緩衝剤, 25  $\text{mM}$

を含むものである、無血清培地。

10. 当該細胞成分が少なくとも約16%の好中球前駆細胞及び少なくとも約1%の巨核球前駆細胞を含むヒトの造血前駆細胞の無血清懸濁液の調製方法であって、

(a) 骨髓、末梢血、又は臍帯血から造血幹／源細胞を得るステップと

(b) 該幹／源細胞を、造血増殖因子を含む無血清培養培地であって、基本培地と、コルチコステロイドと、トランスフェリンと、インシュリンと、コレステロールと、エタノールアミンと、そしてヒトアルブミンと、を含む培地内において約7乃至14日間培養するステップと、

を含む方法。

11. 該ヒトアルブミンが脱イオンされているものである、請求項10の方法

。

25. コロニー形成単位 (CFU) 及びクラスター形成単位 (cIFU) を更に含むものである、請求項18の細胞懸濁液。

26. 該合計CFU/cIFUの少なくとも約40%が顆粒球-マクロファージコロニー形成単位であり、かつ該合計CFU/cIFUの少なくとも約40%が顆粒球クラスター形成単位である、請

求項25の細胞懸濁液。

27. 該細胞の少なくとも約20%がCD15+/CD11b-であり、該細胞懸濁液が実質的に動物蛋白質不含である、ヒトの造血細胞の無血清懸濁液。

28. 造血細胞の懸濁液中の巨核球前駆細胞の数を決定するための方法であって、

(a) 混合物を形成するために該細胞懸濁液のサンプルをフィブリノーゲンとトロンビンと混合し、

(b) 該混合物を顕微鏡スライド上におき、該混合物に該造血細胞を含んだフィブリン凝塊を形成させ、

(c) 該細胞を14日間該フィブリン凝塊中で培養し、該巨核球前駆細胞を増殖させて巨核球を形成させ、

(d) 該フィブリン凝塊中の該細胞を固定し、

(e) 該固定された細胞を血小板糖蛋白質IIb/IIIaに特異的な1次抗体と接触させて、それにより巨核球に特異的に結合させ、

(f) 該巨核球を2次抗体及び免疫ペルオキシダーゼ呈色反応によって標識し、それにより該巨核球に特有な色を獲得させ、

(g) 該全細胞集団内の該特有な色によって標識された巨核球の数を評価し、そして

(h) 該造血細胞の元の懸濁液中に存在した該巨核球前駆細胞の数を外挿すること、

を含む方法。

29. 当該細胞成分が該CD41a<sup>+</sup>細胞集団の形態学的に認識

しうる巨核球を含むものであるヒトの巨核球の分化した懸濁液を調製するための

**【発明の詳細な説明】****無血清培地内での好中球前駆細胞及び巨核球前駆細胞の  
試験管内増殖****技術分野**

本発明は、一般的には無血清培地中で培養されたヒトの造血細胞に関する。より具体的には、本発明は、好中球減少症と血小板減少症の治療に有用な好中球前駆細胞と巨核球前駆細胞について濃厚化した、無血清細胞懸濁液に関する。

**本発明の背景**

高投与量の化学療法や高線量の照射のような癌治療は、骨髓中の造血細胞を破壊し、該患者を好中球と血小板が激しく減少した状態に置く。このような治療の後には、患者は好中球減少症からくる感染と発熱のため集中治療下でしばしば数週間を過ごす。血小板減少症は、血小板輸血を必要とする凝固作用の減少や出血性障害をもたらす。好中球と血小板の不足は、これらの癌治療の後の疾病と死亡の第一原因であり、癌治療の高いコストの一因となっている。

幾つかの方法は治療後に該患者の免疫系を回復させることに向けられている。成熟した感染防御細胞へと増殖し分化するよう残った幹細胞を刺激するために、造血性増殖因子が治療後に投与される。造血性増殖因子は、好中球減少症の全体の期間を短縮することができるが、該患者がおもい好中球減少でありこのため感染しやすい、治療直後の重症の10日から15日の期間が残る。増殖因子による刺激をしても該患者の幹細胞が増殖し、成熟した好中球に至るさまざまな分化の段階を通して、進行するためには10日から15日が

必要とされる。巨核球と血小板の回復には、さらに長い、一般的には15日より長い時間が要求される。このように増殖因子治療は、該患者の感染防御細胞と血液凝固能力がその間不足しているギャップを残す。

治療後の骨髓移植もまた、約10日から15日後に起こる好中球減少症を改善することができる。異系同種骨髓移植はしばしばGVH病を合併することから、自家骨髓移植が、実際に行えるなら常に好ましい。骨髓は治療前に該患者から收穫され、凍結され、そして解凍されて治療後に該患者中に移植されて戻される。

培地中の動物の血清又は動物の蛋白質なしに増殖されたならば、大いに高められたであろう。

伝統的には動物血清の補充は培養培地組成において、蛋白質と増殖因子との源として頼りにされていた。外来の蛋白質の注入によって生じる、生命を脅かす免疫反応の可能性のため、研究者達は治療のための細胞の増殖のための、動物蛋白質を含まない培地組成を永い間探してきた。しかしながら、動物血清、特に胎仔牛血清は、多くの未知の増殖因子を含んでおり、ある因子は、それぞれの細胞のタイプにとって多かれ少かれ重要である。たとえ胎仔牛血清中の全

ての因子が同定されて化学的に合成されても、どの因子がそれぞれの細胞のタイプの増殖と分化を促進するかを見つけ出すことは、依然として試行錯誤と多くの実験の問題であろう。該困難性にも係わらず、研究者達はその中で特定の造血細胞が増殖することのできる無血清培地を処方化することに成功してきた。

牛血清アルブミンとさまざまな造血増殖因子を含んだ無血清培地組成が鼠の骨髓細胞の増殖を促進することが示された (Ponting, I. L. O., et al., Growth Factors 4:165-173, 1991; Merchauv, S., et al., Internatl J Cell Cloning 2:356-367, 1984; )。

無血清培地の13の異なった組み合わせが、ヒトの造血源細胞の *in vitro* での培養のための血清含有培地の代替物としては望みのないことが証明された (Wu, Z-H., et al., Pathology 22:145-148, 1990)。白血病細胞の増殖に対する無血清培地の効果が報告された (Da, W. M., et al., Brit J Haematology 78:42-47, 1991)。無血清培地における赤血球造血細胞の増殖についても報告された (Lansdorp, P. M., et al., J Exp Med 175:1501-1509, 1992)。上記の無血清組成の全ては牛血清アルブミンの形で動物蛋白質を含んでいた。

ヒトの好中球前駆細胞と巨核球前駆細胞の増殖と分化を助ける無血清の、動物蛋白質不含の培地組成に対する必要性が残っている。得られる細胞懸濁液は、癌

図4は10日間無血清培養における好中性骨髓球（黒色矢印）と好中性後骨髓球（中空矢印）を示している。

図5はフローサイトメトリーにより決定された細胞の表現型を示している。

図6はコロニー（黒色矢印）とクラスター（中空矢印）の典型的な領域を示している。

図7は骨髓球細胞（青）の領域における免疫細胞化学的に標識された巨核球前駆細胞（赤）を示している。

図8はフローサイトメトリーにおける該細胞の前方光散乱を示している。（a）対照 （b）抗CD41a

図9はフィブリン凝塊アッセイにおいて発達した典型的な巨核球バーストを示す。

図10は通常の培地と比較した無血清培養における巨核球細胞増殖の動力学を示している。

図11は分離されたCD34<sup>+</sup>培養からの巨核球増殖に対する通常の培地と比較した無血清の培養培地の効果を示している。

図12は異なった培養における巨核球の増殖比較を示している。

図13は巨核球増殖に対するさまざまなサイトカインの組み合わせの影響を示している。

#### 本発明の詳細な記述

本発明は、ヒトの好中球前駆細胞と巨核球前駆細胞の *in vitro* での増殖のための無血清の培地組成を提供する。得られる無血清の、動物蛋白質不含の細胞懸濁液は、好中球減少症と血小板減少症の治療のために患者に注入するのに適している。該細胞懸濁液中に動物蛋白質を含まないことは特に有利である。なぜなら、動物蛋白質はヒトにおいて免疫反応を引き起こすことが知られているからである。さらに、該懸濁液中の細胞の高い割合が、注入後すぐに患者内で分化して成熟した好中球、巨核球及び血小板を形成すると期待される、適切に進行した分化段階にある。

該無血清培地組成における必須の試薬は、基本培地、コルチコステロイド、ト

可能にすることが期待される。

ここに、「無血清」という言葉は、動物やヒトのいかなる形の全血清も含んでいない培地組成をいう。ここに、他の血清成分から精製された蛋白質は無血清と見なす。

ヒトの血清アルブミン (HSA) は、該培地において蛋白質源を

提供する。造血細胞が育つことができるように血液の粘度と似た粘度を提供するために蛋白質が要求されると一般に信じられている。さらには、蛋白質は、さもないければ細胞膜蛋白質を消化しかねないプロテアーゼのための基質として働く。アルブミンは微量元素と必須脂肪酸のための担体として働くと考えられている。HSAは、その低い免疫原性から牛血清アルブミン (BSA) のような動物由来の蛋白質に対して大きな利点を持つ。該HSAはプールしたヒトの血漿画分から得られ、又は細菌及び酵母のような宿主又はジャガイモとトマトのような植物細胞中において組換えにより製造されることができる。好ましくは、本発明の組成に使用されている該HSAはパイロジェンやウイルスを含まず、ヒト患者への注入に関して規制当局から許可を受ける。該HSAは該培地に使用するに先立ち、樹脂ビーズを用いてイオンを除去されてよい。

これらの無血清培地組成に使用されているトランスフェリンとインシュリンは動物の血清由来でもよいが、組換えにより合成された生産物を使用するのが最も好ましい。トランスフェリンとインシュリンが動物源由来であれば、それらは他の動物蛋白質を除去するために精製され、少なくとも99%純度である。トランスフェリンは僅か25~125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でこれらの組成中で使用され、一方インシュリンは僅か1~25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で使用される。従って、該培地中のインシュリンとトランスフェリン以外の動物蛋白質のいかなる痕跡も、HPLC及びゲル電気泳動といった標準の技術を使用しては検知不能である。ここに「動物蛋白質の実質的不含」という語は、トランスフェリン又はインシュリン以外の動物蛋白質が検知できない培地組成又は細胞懸濁液をいう。「動物」という語は微生物

とヒトを除外するものと理解される。

培地”295-1”としてここで知られている上述の試薬を含んだ培地組成は、下で述べられるように好中球前駆細胞の集団内での巨核球前駆細胞の発生に対して最適であることが見いだされた。しかしながら、該上述の必須の試薬に他の脂質を添加すると好中球前駆細胞の増殖潜在力を高めることができることが発見された。所望により、トリグリセリド及び／又はリン脂質が付加的な脂質源として加えられる。好ましい脂質源は、Intralipid® (K a

b i P h a r m a c i a) に代表される、大豆油と卵黄リン脂質から調製される無菌の、非パイロジェン性の脂肪乳濁液である。このような調合剤は、好ましくは主としてリノール酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、及びステアリン酸のような不飽和脂肪酸の中性トリグリセリドの混合物を含む。このような調合剤は、卵黄からのホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルコリンを含んでいてもよい。他の脂質源はエタノールによって沈殿され、好ましくはパスツール殺菌によってウイルス不含有にされたヒトの

血漿画分である。例えば、増殖を高める培地補充剤、Nutrimax™ (Baxter Hyland) はコーン画分 IV<sub>4</sub> に由来し、コレステロール並びにトリグリセリドを含む。コレステロール含有脂質調製物が使用される場合、該脂質調製物が少なくとも約 30 µg/ml の最終濃度のコレステロールを供給することができる限り、上述の 295-1 組成におけるコレステロールを該脂質調製剤で置き換えることができる。

上述の無血清組成を用いると、好中球と巨核球の前駆細胞の最善の集団が *in vitro* でつくられる。該細胞は骨髓、臍帯血又は末梢血のいずれからでも生じる。骨髓サンプルは正常な供与者又は患者のいずれからでも得られることができる。臍帯血は正常な妊娠後得られる。末梢血は通常の供与者又は癌患者のいずれからでも得られる。ある場合には、癌患者は、「動員」即ち彼らの幹細胞を骨髓から彼らの末梢血流に移動させ、それにより彼らの末梢血サンプルにおける幹／源細胞の数を飛躍的に増加させるため彼らの幹細胞を刺激するため、造血増殖因子によって処理される。

合、該細胞は栄養物を補給し、老廃物を除去するために5日乃至7日の間隔で培地供給される。

細胞は7～14日、より好ましくは9～12日間無血清培地で培養される。この時間において、該細胞懸濁液は好中球減少症と血小板減少症の治療において使用されるのに適した好中球と巨核球との前駆細胞の集団を含んでいる。無血清培地組成295-1が使用された場合、該細胞集団は少なくとも約16%の好中球前駆細胞と少なくとも約1%の巨核球前駆細胞を含んでいる。好ましくは、該細胞集団は30%を越える好中球前駆細胞、より好ましくは60%を越える好中球前駆細胞を含む。該好中球前駆細胞集団は、成熟した帯状の及び分節のある好中球の前駆細胞である芽球、前骨髓球、好中性骨髓球、及び好中性後骨髓球からなる(Marmont, AM., et al., IN "Neutrophils", Atlas of Blood Cells, Function and Pathology, Eds. Zucker-Franklin, D., et al., 2nd Edition, pp. 159-190; Jandl, JH 1987 Blood, Textbook of Hematology, Little, Brown & Co., Boston/Toronto, pp. 441-480)。

該10日無血清培養のフローサイトメトリー分析が細胞表面抗原による標識に基づいて細胞表現型を決定するために行われた。CD15抗原に関して正であり、CD11b抗原に関して負である(CD15+/CD11b-)細胞は主として骨髓球と前骨髓球であることが形態学的分析から示されている(Smith, S.L., et

al., 上記)。CD15+/CD11b+である細胞は主として成熟した分節のある好中球であることが示されてきた。本発明の該10日無血清培養は20～60%のCD15+/CD11b-の細胞を含んでいることが示された。該培養が10日目に無血清から血清含有の培地に移された場合、該表現型はCD15+/CD11b+標識によって同定されるように主として成熟した形へと前進的分化するのが見られた(図5c)。

該上述の細胞集団は、剥奪療法後の患者に投与された場合、該投与された細胞は、成熟した好中球と最終的には血小板を生成する巨核球とを生成するために *in vivo* でさらに分化することが期待される。該期待は、この細胞集団をさらに10日間培養するために血清含有培地に移すと、該集団はより成熟した好中球形態へと進行するという発見に基づいている(図1)。さらにフィブリン凝塊アッセイの中においたとき、該巨核球前駆細胞は成熟した巨核球を形成しそして血小板を放出することが観察される。これらのアッセイからの結果は、該無血清培養からの細胞はそれらが *in vi*

*vo* の条件に帰された後でもさらなる成熟をすることができることを示唆する。

該7~14日の無血清細胞培養の基本的な利点の一つは、上述の通り、より成熟した好中球と巨核球の前駆細胞のその集団にある。しかしながら、この細胞培養の他の利点はより早期の細胞のタイプ、即ち増殖と分化の多くの連続したくり返しが可能な「源細胞」のその小さな集団による。これらの源細胞の娘細胞は好中球と巨核球のより遅れた集団を供給するために成熟化において該前駆細胞に続き、それにより該元の細胞懸濁液の注入によって可能な有効な治療の持続を延長させると期待される。

該好中球の系列内の源細胞はコロニー形成単位(CFU)とクラスター形成単位(cIFU)として同定される。CFUという語はここでは14日間血清含有メチルセルロース培養において平板培養した場合、増殖して、密接に連携した50個又はそれより多い細胞よりなる集団(「コロニー」)を形成する単一の細胞として定義される。同一の状況下で、cIFUは50個より少ない細胞よりなる集団(「クラスター」)を形成する。コロニーはライトーギムザ染色によって同定されるものとしての、それらが含んでいる該細胞のタイプによりさらに定義される(Zucker-Franklin, et al., 上記)。最終的には成熟した好中球と単球を形成すると期待される該コロニーは、「顆粒球/マクロファージ」又はGMと名づけられる。該クラスターは早期の顆粒球前駆細胞とマクロファージによって(顆粒球のタイプが支配的な状態で)構成される。

該295-1無血清組成への脂質の付加は、該集団においてCF

らの細胞懸濁液における好中球と巨核球の前駆細胞の濃縮は、該患者に戻される一層少ない全細胞によって望みの細胞の有効治療数を投与することを許容する。当業者は彼ら自身の臨床的な経験に基づき及び幹細胞注入に関する文献からのガイドラインを用いて、該細胞懸濁液の投与のための最適な量や条件を決定することができるであろう (Spitzer, G., et al., Blood 55 : 317-323; Douay, et al., Exp Hematol 14 : 358-365, 1986)。

次の実験例は本発明を説明するものであって、その範囲を制限するものではない。

#### 実施例 1

##### 無血清培地組成

無血清培地は次のように配合された。最適な濃度は細胞増殖を基礎として別個の滴定によって決定された。

##### 「295-1」組成

Isocove's 改良ダルベッコ培地 (IMDM, Sigma

) 又は McCoy's 5A (Sigma)

HEPES 緩衝剤、10~25mM、最適 25mM

ヒドロコルチゾン、1~10 $\mu$ M、最適 200ng/ml

トランスフェリン (ヒト完全) (Sigma)、25~125 $\mu$ g/ml、最適 75 $\mu$ g/ml

インシュリン (ヒト、組換え、Novo Nordisk, Princeton, N. J.)、1~25 $\mu$ g/ml、最適 10 $\mu$ g/ml

セレン、0.017~5ng/ml、最適 5ng/ml

$\alpha$ -モノチオグリセロール、10~160 $\mu$ M、最適 216ng/ml

$\beta$ -メルカプトエタノール、20~100 $\mu$ M、最適 50 $\mu$ M

ゲンタマイシン、10~50 $\mu$ g/ml、最適 50 $\mu$ g/ml

次のものから選ばれた組換えヒト造血増殖因子、即ち rIL-3 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、rG-CSF (Amgen)、rGM

/ml。

3. 大豆油と卵黄から得られた脂質 (Intralipid®, Kabi Pharmacia, Clayton, NC; 50%リノール酸、26%オレイン酸、10%パルミチン酸、9%リノレン

酸、及び3. 5%ステアリン酸を含む脂肪酸残基を有する中性トリグリセリド; 主としてホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンを含むリン脂質) 0.03~2%、最適1%。

それぞれの脂質の貯蔵溶液は、1:10の希釈でエタノール中に調製された。所望により Intralipid® は30分間試験管内で超音波処理された。

対照の血清含有培地 (HLM) は、上述の基本培地、標準補充物と増殖因子に加え、12.5%胎仔牛血清と12.5%馬血清 (Sigma) から構成される。

## 実施例2

### 造血幹/源細胞の調製

単核球細胞は骨髓、臍帯血、又は末梢血のサンプルから得られた。正常の個体が骨髓と臍帯血を与えた。末梢血細胞は、造血増殖因子の投与によって骨髓から末梢血に造血細胞が「動員」されている癌患者から得た (Brandt, S.J., et al., 上記; Crawford, J., et al., 上記; Neidhart, J., et al., 上記)。該サンプルの中の細胞はHistopaque® (Ficoll® Hypaque®, Sigma) を通じて遠心分離によって分離され、界面領域から単核球細胞が収集された (Smith, S.L., et al., Exp Hematol 21:870-877, 1993)。

該単核球細胞の懸濁液は以下に述べるように磁性ビーズを使用してCD34+の正の選択性によって幹/源細胞について濃縮された。該単核球細胞を最初に $10^6$ 個の細胞当たり0.5 $\mu$ gの抗CD34抗体で氷上30分間感作した〔無血清細胞培養によって調製さ

）。該250mlバッグは20～60mlの細胞懸濁液で満たされ、該500mlバッグは60～100mlの細胞懸濁液で満たされ、そして該1000mlバッグは100～400mlの細胞懸濁液で満たされた。該培養物は以下の実施例において示される該時間の間、5%CO<sub>2</sub>/5%O<sub>2</sub>、37°C、高湿度の培養器内に置かれた。該培養物は1:2又は1:4の希釈で5～7日の間隔で補給された。

該培養物中の非粘着性の細胞の濃度は、該培養物の0.5mlを9.5ml、10%のセトリミド(Sigma)で希釈し、Coulter ZBI(Coulter Electronics, Hialeah, FL)でカウントすることで決定された。

#### 実施例4

##### 無血清培地における好中球前駆細胞の増殖の評価

実施例3の該細胞培養物は、培養中の指定された日にサンプルされ、ライトーギムザ法によって染色され、そして形態学的特徴に基づいて分別的にカウントされた(Marmont, A. M., et al. "Neutrophils", in Atlas of Blood Cells, Eds. Zucker-Franklin, D., et al., 2nd Edition, pp. 159-190; Jandl, J. H. (1987) Blood, Textbook of Hematology, Little, Bro

wn & Co., Boston/Toronto, pp. 441-480)。

図1は血清含有培地("HLTM")における増殖と比較した無血清培地組成295-1(実施例1)において増殖させた典型的な細胞培養の分別細胞カウントを表している。造血増殖因子が次のように両方の培地に加えられた。即ち、1000U/mlのIL-3、500U/mlのG-CSF、500U/mlのGM-CSF、及び20ng/mlのSCFである。培養の10日目に、無血清培地中で増殖させた細胞サンプルは追加の10日間血清含有培地に移された。

さまざまな細胞タイプの形態例が次の図に示されている。

図2. 芽球(黒矢印)

### 定される表現型

培養の10日と20日において、 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞の部分標本が該培養容器から取り出され、0.05%の牛血清アルブミンと0.1%のアジ化物(PAB)を含んだリン酸塩緩衝食塩水中で1~2回洗浄された。次いで該細胞はCD15(LeuM1)FI

TC接合モノクローナル抗体及びCD11b(Leu15)PE接合モノクローナル抗体(Becton Dickinson)で氷上10分間標識された。PAB中でさらに1回洗浄された後、該細胞は1mlのPAB中に懸濁され、そしてCD15とCD11bの同時発現についてフローサイトメトリーによって分析された。

10日目では、CD15+CD11b-表現型は無血清培養において該細胞の20~60%を構成しており、これは血清含有培養の10日目のプロフィールと似ていた(図5a, 右下の象限)。20日目では、無血清培地において保持されたきた培養物は依然としてCD15+CD11b-表現型を主として含んでいた(図5b)。対照的に、20日目においては、10日目に無血清培地から血清含有培地に移された培養物はCD15+CD11b+表現型の70~100%分化した細胞を含んでおり、これは20日全て血清含有培地において増殖させた培養物の表現型のプロフィールと類似していた(図5c)。

CD15+/CD11b-の細胞はFACS細胞分類によって分類され、分化の前骨髓球と骨髓球の段階にある好中性前駆細胞として形態学的に同定された(Smith, SL, et al., 上記)。CD15+/CD11b+の細胞は分類され、そしてより成熟した型、即ち後骨髓球、帯状核白血球及び分節のある好中球として同定された。

### 実施例6

#### 無血清培養におけるコロニー形成単位及びクラスター形成単位

細胞は次の増殖因子を用いたさまざまな培地組成において培養された。即ち、300U/mlのIL-3、300U/mlのG-C

表 1

| PB1         |              | P.I. | GM I. | Mac I. | BFUE I. | Mixed I. | Cluster I. |
|-------------|--------------|------|-------|--------|---------|----------|------------|
| 培養培地        |              | 10日  | 10日   | 10日    | 10日     | 10日      | 10日        |
| 脱付<br>Tb7シ  | 基本培地         | 11.9 | 1.5   | 0.0    | 7.6     | 0.0      | 15.5       |
|             | +Intralipid  | 12.6 | 3.9   | 0.0    | 8.5     | 0.0      | 18.9       |
|             | +129-87シ     | 9.9  | 0.7   | 0.0    | 0.5     | 0.0      | 12.9       |
|             | +Intra./129. | 10.3 | 1.4   | 0.3    | 0.4     | 0.0      | 8.2        |
| 非脱付<br>Tb7シ | 基本培地         | 13.2 | 1.4   | 0.7    | 7.0     | 2.0      | 25.1       |
|             | +Intralipid  | 6.7  | 0.5   | 0.0    | 1.1     | 0.0      | 2.0        |
|             | +129-87シ     | 7.3  | 2.0   | 0.6    | 8.5     | 2.2      | 5.8        |
|             | +Intra./129. | 10.3 | 3.3   | 0.8    | 16.6    | 11.8     | 12.4       |
| 血清対照        | IMDM +25%    | 14.4 | 5.8   | 1.6    | 14.5    | 2.2      | 20.2       |
|             | HLTM         | 14.7 | 4.9   | 0.6    | 6.2     | 2.2      | 27.9       |

| PB2         |              | P.I. | GM I. | Mac I. | BFUE I. | Mixed I. | Cluster I. |
|-------------|--------------|------|-------|--------|---------|----------|------------|
| 培養培地        |              | 10日  | 10日   | 10日    | 10日     | 10日      | 10日        |
| 脱付<br>Tb7シ  | 基本培地         | 9.9  | 0.5   | 0.0    | 0.4     | 0.0      | 2.8        |
|             | +Intralipid  | 33.3 | 0.5   | 0.2    | 0.6     | 0.1      | 8.2        |
|             | +129-87シ     | 26.2 | 7.5   | 0.9    | 1.7     | 0.4      | 19.0       |
|             | +Intra./129. | 23.7 | 5.2   | 2.5    | 1.1     | 0.7      | 53.7       |
| 非脱付<br>Tb7シ | 基本培地         | 4.2  | 0.1   | 0.0    | 0.1     | 0.0      | 0.6        |
|             | +Intralipid  | 23.7 | 2.4   | 0.3    | 1.2     | 0.3      | 9.5        |
|             | +129-87シ     | 15.1 | 0.7   | 0.1    | 0.6     | 0.1      | 6.5        |
|             | +Intra./129. | 33.3 | 0.5   | 0.0    | 0.2     | 0.0      | 1.9        |
| 血清対照        | IMDM +25%    | 38.2 | 7.5   | 1.4    | 4.7     | 2.2      | 18.6       |
|             | HLTM         | 45.3 | 0.9   | 0.1    | 0.5     | 0.0      | 9.5        |

| G.M.        |              | P.I. | GM I. | Mac I. | BFUE I. | Mixed I. | Cluster I. |
|-------------|--------------|------|-------|--------|---------|----------|------------|
| 培養培地        |              | 10日  | 10日   | 10日    | 10日     | 10日      | 10日        |
| 脱付<br>Tb7シ  | 基本培地         | 7.3  | 1.0   | 0.0    | 0.8     | 0.0      | 138.7      |
|             | +Intralipid  | 9.4  | 0.8   | 0.1    | 0.5     | 0.0      | 94.0       |
|             | +129-87シ     | 8.6  | 2.2   | 0.3    | 0.7     | 0.0      | 292.4      |
|             | +Intra./129. | 10.3 | 12.1  | 10.6   | 2.5     | 0.0      | 1585.6     |
| 非脱付<br>Tb7シ | 基本培地         | 6.5  | 2.0   | 0.5    | 6.0     | 0.0      | 221.0      |
|             | +Intralipid  | 7.6  | 3.3   | 0.8    | 8.5     | 0.1      | 311.6      |
|             | +129-87シ     | 4.8  | 0.2   | 0.1    | 0.8     | 0.0      | 91.2       |
|             | +Intra./129. | 7.6  | 0.4   | 0.1    | 2.1     | 0.0      | 76.0       |
| 血清対照        | IMDM +25%    | 17.5 | 1.0   | 0.5    | 11.5    | 0.8      | 455.0      |
|             | HLTM         | 22.6 | 5.5   | 1.7    | 41.3    | 0.7      | 949.2      |

## 平均

|             |              | P.I. | GM I. | Mac I. | BFUE I. | Mixed I. | Cluster I. |
|-------------|--------------|------|-------|--------|---------|----------|------------|
| 培養培地        |              | 10日  | 10日   | 10日    | 10日     | 10日      | 10日        |
| 脱付<br>Tb7シ  | 基本培地         | 9.7  | 1.0   | 0.4    | 2.9     | 0.0      | 52.3       |
|             | +Intralipid  | 18.4 | 1.8   | 0.4    | 3.2     | 0.0      | 40.4       |
|             | +129-87シ     | 14.9 | 3.5   | 0.5    | 1.0     | 0.1      | 108.1      |
|             | +Intra./129. | 14.8 | 6.2   | 1.8    | 1.3     | 0.2      | 542.5      |
| 非脱付<br>Tb7シ | 基本培地         | 8.0  | 1.2   | 0.7    | 4.4     | 0.7      | 62.2       |
|             | +Intralipid  | 12.7 | 2.1   | 0.7    | 3.6     | 0.1      | 107.7      |
|             | +129-87シ     | 9.1  | 1.0   | 0.7    | 3.3     | 0.8      | 34.5       |
|             | +Intra./129. | 17.1 | 1.4   | 0.8    | 8.3     | 3.9      | 30.1       |
| 血清対照        | IMDM +25%    | 23.4 | 4.8   | 0.7    | 10.2    | 1.7      | 164.6      |
|             | HLTM         | 27.5 | 3.8   | 0.7    | 16.0    | 1.0      | 328.9      |

(31)

表 3

| 培養培地            | P. I. | GM I. | Mac I. | BFUE I. | Mixed I. | Cluster I. |
|-----------------|-------|-------|--------|---------|----------|------------|
| 205-1<br>+ 脂質 I | 52    | 8     | 5      | 1       | 2        | 522        |
| 対 照<br>+ 血清     | 40    | 8     | 27     | 3       | 24       | 386        |
| 対 照<br>- 血清     | 20    | 1     | 1      | 1       | 1        | 49         |

(骨髓及び末梢血からの4-10培養の平均)

囲にわたった。

一般的に、10日の培養ではCFU-GMの数は0日目の5～20倍に増加した。10日の培養ではCFU-Macの数は0日目の2～10倍に増加した。特に10日の無血清培養におけるクラスター形成単位の数は0日目の10～600倍に増加した。

該メチルセルロースアッセイの14日においては、GMコロニーは全コロニー／クラスターの約10～50%を構成しており、Macコロニーは全コロニー／クラスターの約5～20%を構成しており、そしてクラスターは全コロニー／クラスターの約10～60%を構成していた。

典型的には、10日の無血清培養におけるコロニー形成単位(CFU)＋クラスター形成単位(cIFU)の割合は比較的低く、全細胞の約1乃至5%の範囲にわたった( $\%CE = \%クローニング効率 = \frac{\text{全コロニー} + \text{全クラスター}}{\text{播種された全細胞}} \times 100$ )。しかしながら、該全CFU／cIFU内のcIFUの割合は比較的高く、全CFU／cIFUの約10乃至50%の範囲にわたった。10,000細胞当たりのクラスター形成単位の絶対数は16乃至136の範囲にわたった。クラスター形成単位は帯状核白血球及び分節のある好中球のような骨髓球のより成熟した形へと直接に増殖する個々の細胞である。

#### 実施例7

##### 無血清培地において培養された巨核球前駆細胞の評価

細胞を実施例1において述べられたように無血清培地組成295-1によって、実施例4において述べられたように増殖させた。選

択された培養日において、細胞は顕微鏡用スライド上に細胞遠心され、無水アセトンによって固定され、そしてP2と名付けられた抗CD41aモノクローナル抗体(AMAC, Westbrook, ME)と共にインキュベートされた。該抗体は血小板／巨核球の固有の糖蛋白質質IIb／IIIaを認識する。糖蛋白質質IIb／IIIaは巨核球前駆細胞、成熟した巨核球、そして血小板中には存在するが、他の血球中には存在しない。該1次抗体と共に培養した後、2次抗体(ビオチン化ヤギ抗マウス IgG, Kirkegaard & Perry, Gait

表 5

MK細胞の免疫細胞化学及びフローサイトメトリー

| 培養      | 295   | 時 間<br>(日) | CD41a Immu (%) |      | CD41a Flow (%) |       |                   |
|---------|-------|------------|----------------|------|----------------|-------|-------------------|
|         |       |            | PL-STK         | MK   | MK             | %mFSC | %hFSC             |
| PB CD34 | GF(1) | 7          | 8              | 12   | 17.8           | 83.1  | 17.4              |
| PB CD34 | GF(2) | 7          | 7              | 18   | 17.4           | 82.8  | 16.7              |
| PB CD34 | GF(2) | 7          | 7              | 19   | 17.5           | 81.7  | 18.9              |
| PB CD34 | GF(2) | 7          | 19             | 25   | 16.5           | 81.8  | 18.2              |
| PB CD34 | GF(2) | 7          | 8              | 20   | 15.3           | 83.7  | 16.4              |
| PB CD34 | GF(2) | 8          | 1              | 7    | 2.6            | 84.6  | 15.4              |
| PB CD34 | GF(2) | 8          | 0              | 6    | 3.3            | 89.9  | 12.1              |
| PB CD34 | GF(1) | 8          | 0              | 4    | 3.0            | 90.0  | 10.0              |
| 平 均     |       |            | 6.3            | 13.9 | 11.7           | 84.7  | 15.6              |
| 平均偏差    |       |            | 2.2            | 2.7  | 2.6            | 1.2   | 1.1               |
| PB CD34 | GF(1) | 10         | 0              | 23   | 20.0           | 77.0  | 23.5              |
| PB CD34 | GF(2) | 10         | 0              | 19   | 20.7           | 73.4  | 26.6              |
| PB CD34 | GF(2) | 10         | 0              | 29   | 19.8           | 73.2  | 26.8              |
| PB CD34 | GF(2) | 10         | 0              | 33   | 21.3           | 76.1  | 23.9              |
| PB CD34 | GF(2) | 10         | 0              | 23   | 19.6           | 71.9  | 28.6              |
| PB CD34 | GF(2) | 10         | 0              | 22   | 20.7           | 80.2  | 20.3              |
| PB CD34 | GF(1) | 10         | 0              | 6    | 6.7            | 77.6  | 22.4              |
| PB CD34 | GF(2) | 10         | 0              | 7    | 5.2            | 90.4  | 10.5              |
| PB CD34 | GF(1) | 10         | 1              | 8    | 4.5            | 86.7  | 13.3              |
| 平 均     |       |            | 0.1            | 18.9 | 15.3           | 78.5* | 21.8 <sup>#</sup> |
| 平均偏差    |       |            | 0.1            | 3.3  | 2.6            | 2.1   | 2.1               |

凡例：Immu, 免疫細胞化学；flow, フローサイトメトリー；PL-STK, 血小板が接着したCD41a-陰性細胞；MK, 巨核球様CD41a-陽性細胞；%mFSC, %中等度前方散乱, 該MK集団内のより小さい細胞；%hFSC, %高度前方散乱, 該MK集団内のより大きい細胞。\*7～8日目においてmFSCよりも有意に低い。#7～8日目においてhFSCよりも有意に高い。増殖因子：(1)SCF, IL-3, 及びIL-6；(2)SCF, IL-3, IL-6及びIL-11。

表 7

異なった培養物中の巨核球の分布

| サンプル        | 条 件       | 時間 (日) | CD41a <sup>+</sup> (%) | 細胞 (10 <sup>5</sup> /ml) |
|-------------|-----------|--------|------------------------|--------------------------|
| BM MNC      | HLTM+(1)* | 7      | 2 (0)*                 | 7.4                      |
|             | HLTM+(1)  | 10     | 4 (0)                  | 9.4                      |
|             | 血漿+(1)    | 12     | 14.7 (2)               | 13.0                     |
| RT 555      | 295+(2)*  | 12     | 10 (2)                 | 3.2                      |
| (3/23/93)   | HLTM+(2)  | 12     | 3 (1)                  | 5.8                      |
| UC 166      | 295+(2)   | 14     | 11 (9)                 | 17.3                     |
| (3/17/93)   | HLTM+(2)  | 14     | 0.5 (1)                | 8.4                      |
| GB (2/1/93) | HLTM+(2)  | 13     | 0 (0)                  | ---                      |

\* サイトカイン組み合わせ (1): SCF, IL-3 及び IL-6  
 . サイトカイン組み合わせ (2): SCF, IL-3, GM-CSF  
 及び G-CSF.

# ( ) 内の数字は血小板が接着した細胞 (偽の陽性) を表す

抗CD41a、CD41b (GP I b) 及びCD61 (GP IIIa) によって陽性に染色された血小板が、巨核球の系列ではない他の細胞に接着するのがしばしば観察された。表6に示されたように、フローサイトメトリーは偽の陽性細胞をカウントすることによる血小板接着のアンティファクトの影響を受けていたことが見出された。このため同じモノクローナル抗体を使用したCD41a免疫細胞化学が真の巨核球系列細胞を確認するために利用された。表5に示されるように、該粘着性の血小板 (「PL-STK」) の殆どは培養の7~10日後には消失し、同等の結果が免疫細胞化学とフローサイトメトリーから得られた。

フローサイトメトリーを用いて、CD41a抗原の発現と細胞の大きさが同時に分析された。図8は10日間該無血清培地において増殖させた培養サンプルのフローサイトメトリーの点プロットを示している。X軸は細胞の大きさを計測する前方光散乱 (FSC) を示している。より右の方にプロットされたそれらの細胞はFSCにおいてより高く (hFSC)、細胞の大きさがより大きい。Y軸は

／培地懸濁液の0.5 ml サンプルが通常の顕微鏡スライド上に置かれた。該スライドは湿らせた150 mm ペトリ皿中に置かれ、そして14日間37°C、5

%CO<sub>2</sub>で培養された。この時間の間、元の培養における巨核球前駆細胞は増殖して、巨核球バースト及びコロニーを形成し又はより成熟した単独の巨核球に分化した。そして該フィブリン凝塊培養は実施例7に示されたように固定されて免疫染色された。

前述のMK-CFCアッセイは以前示されたアッセイに対する幾つかの改良と利点を提供する。第一にペトリ皿は該巨核球コロニー培養のための基質として顕微鏡スライドによって置き換えられ、これはこれらの利点を与える：

(1) 該スライドは免疫細胞化学的検出のための蛋白質抗原を保存するための最上の固定液である無水アセトンの使用を可能にする。伝統的には該コロニー培養はアセトン中で溶解するであろうプラスチックのペトリ皿の中で培養されていた。

(2) 該スライドは、各培養のために使用する抗体の量を減少させ、そして染色の間抗体を乾燥させてしまうことによるアンティファクトを少なくすることによって免疫染色を容易にする。

(3) 該スライドは高拡大能の顕微鏡対物レンズを使用することによりそのままの状態の該コロニーの明瞭な検査を可能にする。

伝統的な評価方法は、いかなる染色もなしに倒立顕微鏡下に大きな、高屈折性の細胞のクラスターとして巨核球コロニーが記述されるものである形態的認識 (Sonoda, Y., et al., Blood 81:624-630, 1993)、及び暗い緑色 (背景) に対する明るい緑色として巨核球コロニーが他のコロニーから識別されるものである免疫蛍光顕微鏡法 (Bruno, E., et al., Blood 73:671-677, 1989; Zauli, G., et al., Exp. Hematol. 20:

850-854, 1992) を含んでいた。これらの方法はあいまいな結果を与えた。なぜなら真の巨核球コロニーと、フィブリン凝塊中で同様に増殖する非巨

間は無血清培養（295）中においてのみ検出でき、血清含有（H L T M）培養中には検出できなかった。12日目においては、無血清培養は血清含有培養よりもより多くの巨核球コロニー形成細胞（MK-CFC）及び単一の巨核球（S-MK）を含んでいた。無血清培養へのGM-CSFの添加は巨核球の増殖を容易にするようであった。

#### 実施例9

##### 無血清培地における巨核球の分化

この実施例は血清含有培地と比較して無血清培地内における巨核球へのCD34<sup>+</sup>細胞培養の増殖と分化をさらに評価する。巨核球分化に対する増殖因子の異なった組み合わせの効果も同様に決定された。

骨髓（BM）と末梢血（PB）からのCD34<sup>+</sup>造血細胞の分離と培養は実施例1乃至3において述べられたものと類似した方法によって実施された。簡潔に言えば、PB細胞と血漿の血液成分分離製品が、G-CSF及び／又は化学療法動員の後4～15日の癌患者からCS3000<sup>TM</sup>血液細胞分離器（Fenwal Division, Baxter Healthcare, Deerfield, IL）を使用して同時に収集された。細胞サンプルはクエン酸加ブドウ糖処方A（ACDS）中に収集され、2%胎仔牛血清（FBS）（Sigma, St. Louis, MO）を含んだIscove'sの改良Dulbecco培地（IMDM）（Gibco, Grand Island, NY）によって1:1に希釈された。低密度MNCが300×gで20分間Histopaque<sup>TM</sup> f

icoll-hypaque（1.077g/ml）上の密度遠心分離後に得られた。血漿は、血小板を除去するために200×gで10分間回転され、0.45μmのフィルターを通過させられ、そして-20°Cで貯蔵された。ヒトの線維素欠乏血清はDebiliらによって示されたように（Blood 80:3022（1992））BM移植後の血小板減少症の患者から得た。予備的選別試験において巨核球刺激機能を示していた線維素欠乏血清及び血漿（AS）が約10%の最終濃度にてこれらの実験中で使用された。

CD34正細胞は少しの改良を伴って実施例2において既に示されたようにし

れた無血清及びHLTM培養において決定された。免疫細胞化学は、0日における培養前にCD41<sup>+</sup>細胞が選択されていないBM MNCの0.03% (0.01~0.05%の範囲、n=5)を、及び精製されたBM CD34<sup>+</sup>又はPB CD34<sup>+</sup>細胞の5.3% (2~9%の範囲、n=5)をなすことを示した(図10、0日目)。播種後の最初の数日間は明らかな細胞増殖は観察されなかった。後の評価のため培養を保持するために、細胞は5日目まで収穫されなかった。培養は10~30日の期間増殖さ

れた。幾つかの基質巣がHLTM BM CD34細胞又はMNC培養において時折形成された。無血清培養では数個の散在したマクロファージ様粘着性細胞はあったが、基質巣はなかった。

5日目には、全てのCD34細胞培養が細胞充実性において4~5倍増加し、生存細胞は95%を越えていた。分別細胞カウントは、5日目の無血清のCD34<sup>+</sup>細胞培養物が66.2%の芽球(40~98%の範囲)及び37%の顆粒球系細胞(9~53%の範囲)を含んでいたことを示した。10~12日においては、無血清CD34細胞培養物は21.3±6.5%の芽球(9~47%の範囲)、70.3±6.7%の顆粒球性細胞(42~88%の範囲)、8.2±1.8%のマクロファージ(2~14%の範囲)及び時折エリスロイド細胞(5%)を含んでいた。HLTM CD34細胞培養は、一般的にはより少ない芽球(9.2±3.2%, 1~22%の範囲)とより多い顆粒球性細胞(78.2±5.3%, 65~96%の範囲)を含んでいた。細胞の生存性と増殖は無血清培養よりもHLTM培養の方が僅かに高かった。形態学的に認識しうる成熟した巨核球がHLTM培養において発見されたが、無血清培養においては発見されなかった。骨髓中に存在する成熟した巨核球と比べると、培養で誘導された形態学的に認識しうる巨核球は、より小さな細胞サイズとより分葉の少ない核(2~3葉)を持っていた。

ークに達した。これは主としてそのときの高い細胞充実性及び適度の巨核球頻度による。形態学的に認識しうる巨核球は10～12日目のH L T M培養における全C D 4 1 a<sup>+</sup>細胞の約1/5を占めていた。他は、無血清培養において見出されるものに類似した形態学的に認識できない巨核球であった。巨核球は15日目あたりでH L T M培養から消失した。30日まで進めたH L T M培養も巨核球を回復しなかった。10～12日における無血清又はH L T M培養から得られた巨核球はC D 4 1 aによって鮮やかに染色され、そして免疫細胞化学及びフローサイトメトリーによって容易に認識された。

対をなす末梢血C D 3 4<sup>+</sup>細胞培養が、巨核球増殖を維持するための異なった培養培地の能力比較のために作られた。個々の供与者からの末梢血C D 3 4<sup>+</sup>細胞を無血清及びH L T M培養において増殖させた。培養物には同一のサイトカインの組み合わせが補充され、同一の仕方で再補充された。6つの実験からの結果が図11に示されている。実験1～3はS C F, I L-3, G M-C S F及びG-C S Fが補充されたのに対し、実験4～6はS C F, I L-3及びI L-6が補充された。対をなす培養中の細胞生存性は類似していた。細胞カウントは実験2の例外を除いて無血清培養の方がH L T M培養よりも通常低かった(図11)。無血清培養における巨核球頻度はそれらと対のH L T M培養よりも $7.6 \pm 3.1$ 倍高かつ

た(3～22の範囲)。無血清培養における巨核球の絶対数は、それらと比較されるH L T M培養よりも $17.4 \pm 7.1$ 倍高かった(2～45の範囲)(図11、巨核球細胞充実性)。

他の独立した実験において、*in vitro*での全体の巨核球拡張が、推定培養巨核球生産を最初の巨核球数で割ることによって計算され、そして該培養された細胞の生存性によって標準化された。巨核球拡張倍率は無血清培地では5.1倍であり、H L T M培養では1.4倍であった(表9)。従って、該無血清培地は該H L T M培地よりも良く巨核球増殖を維持したが、これはおそらくC D 3 4<sup>+</sup>細胞からの巨核球分化と巨核球増殖とを容易にすることによるものであろう。

骨髓 MNC, 骨髓 C D 3 4<sup>+</sup>及び末梢血 C D 3 4<sup>+</sup>細胞を含む異なった細

3と組み合わせされると巨核球頻度を変化させることなしに、IL-6より多くの細胞増殖を刺激した。このためGM-CSF+SCF+IL-3を補充された無血清培養は、IL-6+SCF+IL-3を補充された培養よりも高い全細胞カウントと巨核球数を含んでいた(図13、巨核球細胞充実性)。同

じことは、SCF、IL-3、GM-CSF及びG-CSFを補充された無血清培養(図11における実験1~3)をSCF、IL-3及びIL-6を補充された無血清培養(図11における実験4~6)と比較したときも真であった。該SCF+IL-3+GM-CSFの組み合わせに200U/mlのIL-11を加えてもさらなる巨核球増殖を刺激しなかった(図13)。不適当な投与量の可能性を排除するために、IL-11は、末梢血CD34<sup>+</sup>細胞培養においてSCF+IL-3+IL-6の組み合わせで50から800U/mlの間の濃度において滴定された。高添加量IL-11(400U/ml)は細胞増殖を高めたかもしれないが、巨核球増殖に対するこのサイトカインの組み合わせとIL-11との明らかな相乗効果は観察されなかった。

形態学的に認識しうる巨核球は血清含有培養においては発見されたが無血清培養においては発見されていないため、巨核球増殖と形態学的な分化に対する血清の効果が評価された。ヒトのASが種々の時に培養に加えられた。0日目において、対をなす骨髓CD34細胞培養(n=3)にAS単独、サイトカイン(SCF、IL-3及びIL-6)単独、又はAS+サイトカインが補充された。10~12日目においては、AS単独培養は高い巨核球頻度(約15%)を示したがほとんど細胞拡張(0.5~1倍)を示さなかった。一方、サイトカイン単独とサイトカイン+AS培養はより低い巨核球頻度(約8%)及び高い細胞拡張(それぞれ約20倍及び38倍)を示した。形態学的に認識しうる巨核球はAS単独培養及びAS+サイトカイン培養のそれぞれにおいて、全CD41a<sup>+</sup>細胞の1/3~1/2及び1/7~1/3の割合を占めた。実質的には巨

核球の形態を有する細胞はサイトカイン単独培養においては発見されなかった。しかしながら、これらのサイトカイン単独培養に10~12日においてASが加

ーナル抗体は該 *Isolex*<sup>TM</sup> 50 又は *Isolex*<sup>TM</sup> 300 カラム内で  $1 \times 10^4$  細胞当たり  $0.5 \mu\text{g}$  ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の貯蔵バイアル) で該血液成分分離血液製品に加えられた。次いで該細胞は該 *Isolex*<sup>TM</sup> 回転器により 30 分間回転された。該細胞は 1% ヒトの血清アルブミン (HSA) を含んだ RPMI 1640 中において、未結合の 9C5 モノクローナル抗体を除去するために 2 回洗浄された。そして該細胞は  $10 \text{mg}/\text{ml}$  (1%) HSA と  $1 \text{mg}/\text{ml}$  (0.1%) Gammagard<sup>R</sup> (Baxter Healthcare Corp., Hyland Division, Glendale, CA) を含んだ RPMI 1640 で  $1 \sim 2 \times 10^7$  細胞/ $\text{ml}$  まで該カラム内で希釈された。Dynal IgG1FC, ST 磁性ビーズ (Dynal, Oslo, Norway) が対細胞ビーズ比率 0.5 で該細胞懸濁液に加えられ、そして該 *Isolex*<sup>TM</sup> 回転器により 30 分間回転された。そして該 CD34 細胞: ビーズ複合体は磁石を用いて除去された。

該 CD34<sup>+</sup> 細胞: ビーズ複合物は 1% HSA と  $100 \text{ng}/\text{ml}$  の PIXY 321 を含んだ X-VIVO 10 (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) (完全培地) 中に  $3 \times 10^5$  細胞/ $\text{ml}$  に再懸濁された。PIXY は IL-3 と GM-CSF の両方に活性なドメインを含む融合蛋白質である。次いで、得られた細胞: ビーズ複合体の数によって、該懸濁液はガス透過性の培養バッグ (Baxter, Roundlake, IL) 中に入れられ、そして  $37^\circ \text{C}$  で 5% 二酸化炭素に設定された細胞培養インキュベーター内で 48 時間インキュベートされた。該開始時の培養培地は体積で 20~50  $\text{ml}$  であった。これらの容器は第一の培養容器と呼ばれた。

48 時間の培養遊離期間に続いて、該遊離された細胞は Max Sep<sup>TM</sup> 細胞分離器 (Baxter Healthcare, Corp., Irvine, CA) を用いて該磁性ビーズの除去によって該培養から回収された (培養の 9 日目)。そして該遊離された細胞は 2 次培養容器に移され、そして実施例 3 において示されたように培養された。5 日目において、該培養は血球計算盤とトリパンブルー生存性染色を用いて細胞数と細胞生存性につき分析された。次いで該細胞濃度

胞分離器で選択された時に $80 \pm 20\%$ の平均CD34純度を有していた(表12)。CD15<sup>+</sup>細胞、CFUの割合、及び細胞形態学が表12~14に示されている。細胞形態学によって観察したところでは、早期の顆粒球の頻度は表14に示されたように有意差がなかった。しかしながら早期の顆粒球の全数は、細胞100個当たりカウントされた細胞数に該P. I. を掛けた場合、有意に差があった。

表 1 1

5 及び 10 日目における増殖指数  
0、5 及び 10 日目における生存細胞の割合

|             | 0日       | 5日    |          |              | 10日   |          |              |
|-------------|----------|-------|----------|--------------|-------|----------|--------------|
| 培 養         | %<br>生 存 | P. I. | %<br>生 存 | 生 存<br>P. I. | P. I. | %<br>生 存 | 生 存<br>P. I. |
| 平均<br>(n=5) | 90       | 4.0   | 89       | 3.6          | 22.9  | 89       | 20.0         |
| 標準偏差        | 8        | 2.6   | 4        | 2.4          | 15.5  | 3        | 13.0         |

表 1 2

0 日目におけるCD34の純度、培養の10日目におけるCD15  
とCD11B表現型

| 培 養         | %CD34<br>0日 | %CD15 <sup>+</sup><br>%CD11b <sup>-</sup> | %CD15 <sup>+</sup><br>%CD11b <sup>+</sup> | %CD15 <sup>+</sup><br>%CD11b <sup>+</sup> | %CD15 <sup>+</sup><br>%CD11b <sup>-</sup> | 合計<br>%CD15 <sup>+</sup> |
|-------------|-------------|---|---|---|---|--------------------------|
| 平均<br>(n=5) | 80          | 38.05                                     | 22.38                                     | 15.52                                     | 26.05                                     | 41.57                    |
| 標準偏差        | 21          | 8.11                                      | 6.39                                      | 1.78                                      | 6.32                                      | 6.23                     |

たこと。このようにここに記述されたヒトの造血細胞組成物は、IL-3とSCFをのみを例えば含んだ無血清培地において培養されることができる。

表 1 5

12日培養されたCD34<sup>+</sup>細胞の増殖

| サンプル | IL6無し | R&D IL6<br>40ng/ml |
|------|-------|--------------------|
| 平均   | 31.00 | 35.10              |
| 標準偏差 | 13.30 | 15.50              |

表 1 6

12日培養されたCD34<sup>+</sup>細胞における2%CD41a陽性細胞

| サンプル | IL6無し | R&D IL6<br>40ng/ml |
|------|-------|--------------------|
| 平均   | 27.0  | 21.8               |
| 標準偏差 | 21.20 | 10.50              |

表 1 7

12日培養されたCD34<sup>+</sup>細胞×10<sup>6</sup>におけるCD41a<sup>+</sup>細胞の総数

| サンプル | IL6無し | R&D IL6<br>40ng/ml |
|------|-------|--------------------|
| 平均   | 6.25  | 5.90               |
| 標準偏差 | 3.68  | 1.68               |

### 実施例 11

#### ヒトの造血細胞の無血清懸濁液の比較

この実施例はさまざまな無血清培地中でのヒトの造血幹／源細胞の増殖を比較し、異なった培養から産生される前駆細胞を特徴付ける。

末梢血(PB)からのCD34<sup>+</sup>造血細胞の分離と培養は実施例9に記述されたものと同様の方法によって行われた。シクロホスファミド化学療法からの回復期にG-CSFを与えられた5ヒトの患者から血液成分分離製品が、増殖及び前駆細胞の生成の比較のために用いられた。要するに、CD34<sup>+</sup>細胞の分離に続いて、培養はX-vivo 10、X-vivo 15又はX-vivo 20 (BioWhittaker)のいずれかの中での1~5×10<sup>4</sup>細胞/mlの密

20についてそれぞれ、 $20.76 \pm 5.98$ 、 $17.20 \pm 6.63$ 及び $17.63 \pm 6.20$ であった。逆に、より成熟した好中球の割合は10日間の期間では全ての培養において5%未満であった。

巨核球の割合もまた上の培養において該培養期間の最後に決定さ

れた。該結果は、X-vivo 10はX-vivo 15と20に比べ、フローサイトメトリーによって決定されたところによれば、CD41a<sup>+</sup>細胞の有意に高い割合を有していることを示した（それぞれ $p=0.0247$ 及び $p=0.0211$  対t検定）。免疫化学によって評価したとき、該データはフローサイトメトリーから得られた結果と平行していた。この結果は下の表18において示される。

表 1 8

無血清培地で培養されたCD34<sup>+</sup>細胞からの巨核球（CD41a<sup>+</sup>）のパーセント

| サンプル  | X-VIVO 10 |       | X-VIVO 15 |      | X-VIVO 20 |      |
|-------|-----------|-------|-----------|------|-----------|------|
|       | FACS      | ICC   | FACS      | ICC  | FACS      | ICC  |
| 平均    | 9.39      | 10.25 | 6.00      | 6.60 | 6.37      | 8.50 |
| +標準偏差 | 3.75      | 1.70  | 3.47      | 3.43 | 3.43      | 5.19 |

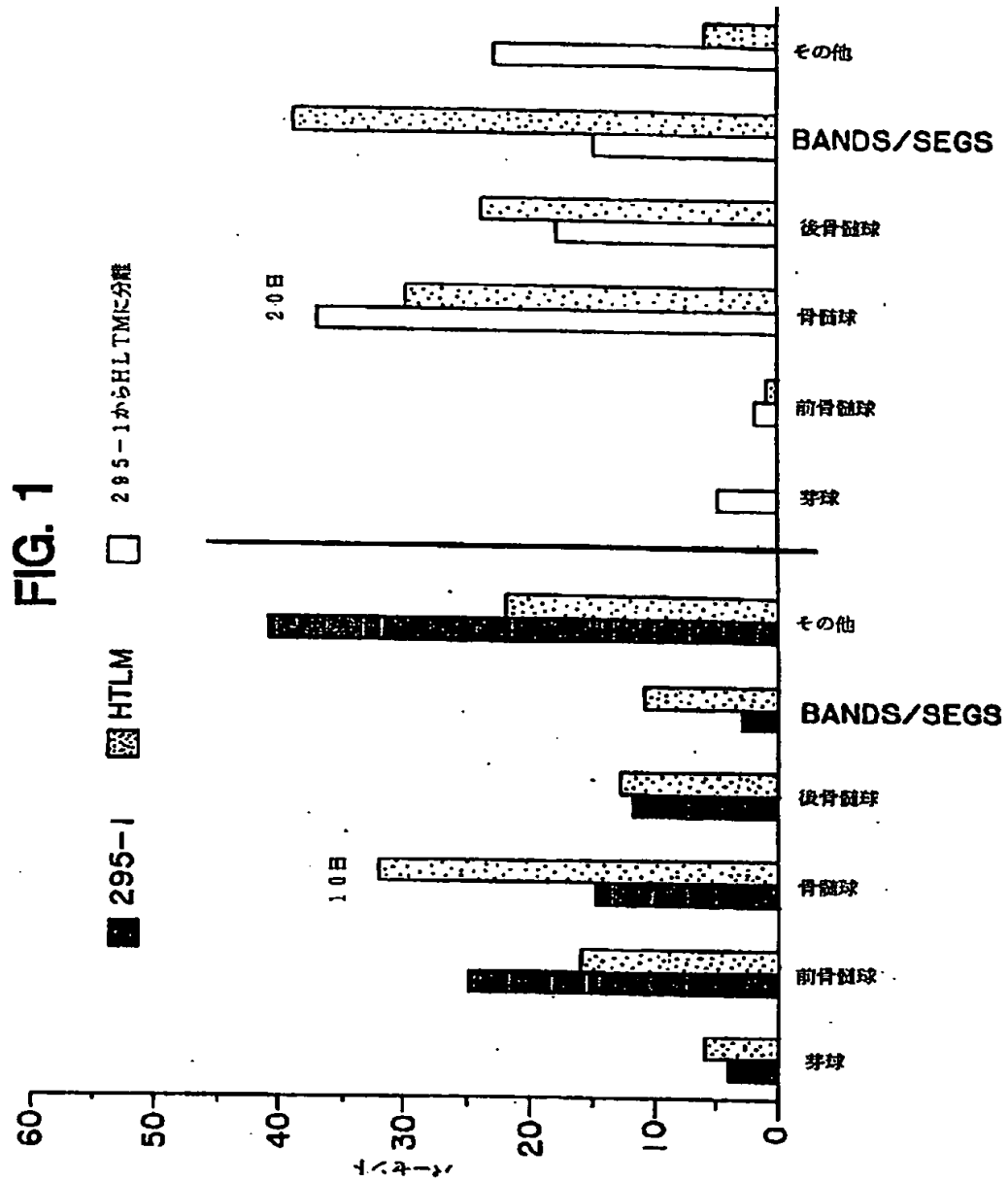
FACS：フローサイトメトリーによって決定されたCD41<sup>+</sup>細胞のパーセント

ICC：免疫化学によって決定されたCD41<sup>+</sup>細胞のパーセント

該3つの無血清培地の各々において拡張させた好中球前駆細胞及び巨核球細胞の総数も同様に評価された。それぞれの系列についての細胞拡張はCD34<sup>+</sup>細胞の初期数（ $10^6$ ）に10日目における増殖指数を掛け、そして個々の系列における細胞のパーセントを掛けることで決定された。両方の系列について、該結果は該培地の

それぞれの間で有意差がないことを示した。例えば、好中球前駆細胞の拡張倍率

【図 1】



【図 3】

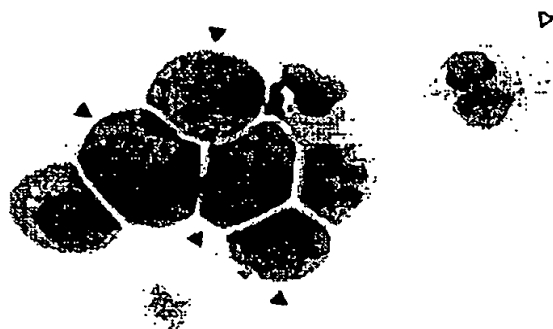


FIG. 3

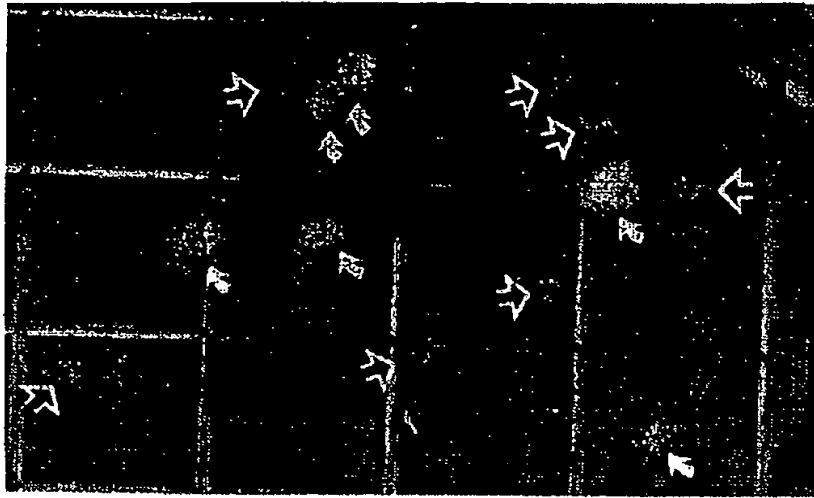
【図 4】



FIG. 4

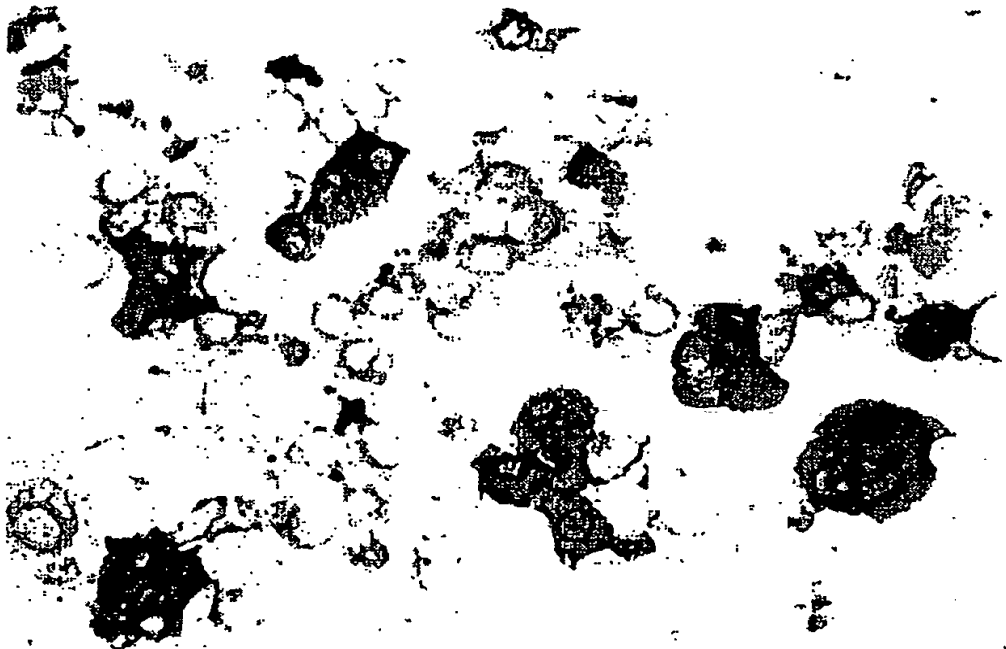
【図 6】

FIG. 6



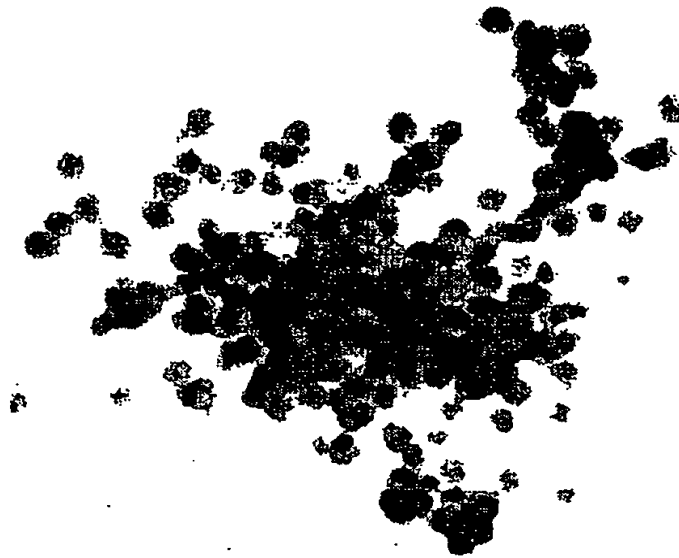
【図 7】

FIG. 7



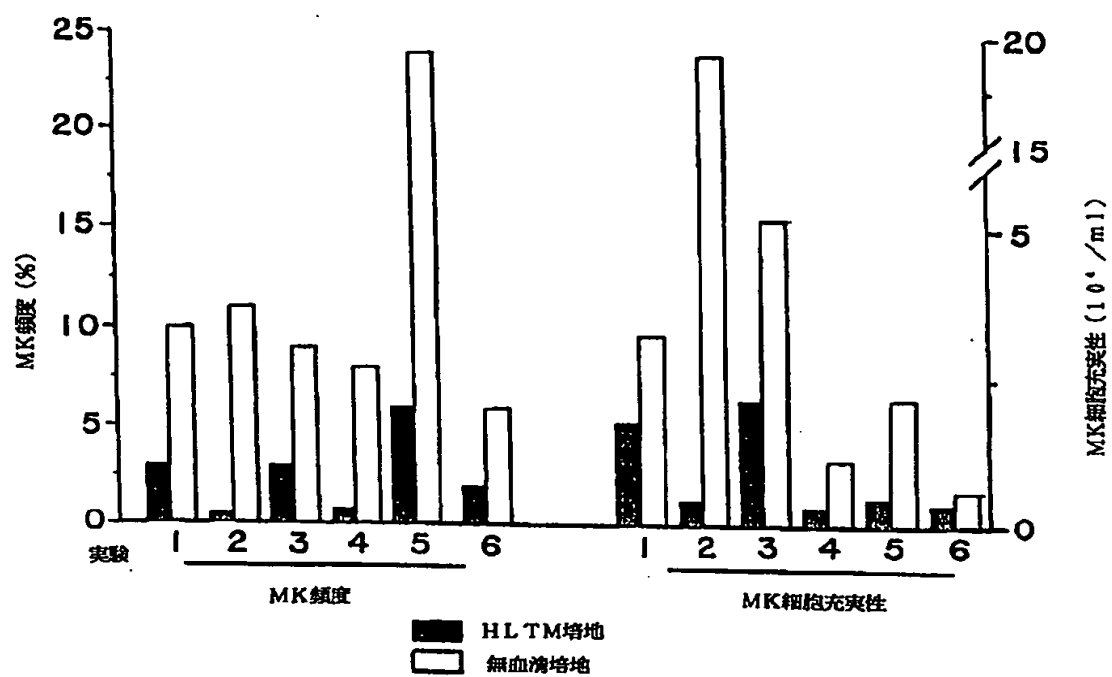
【図 9】

FIG. 9

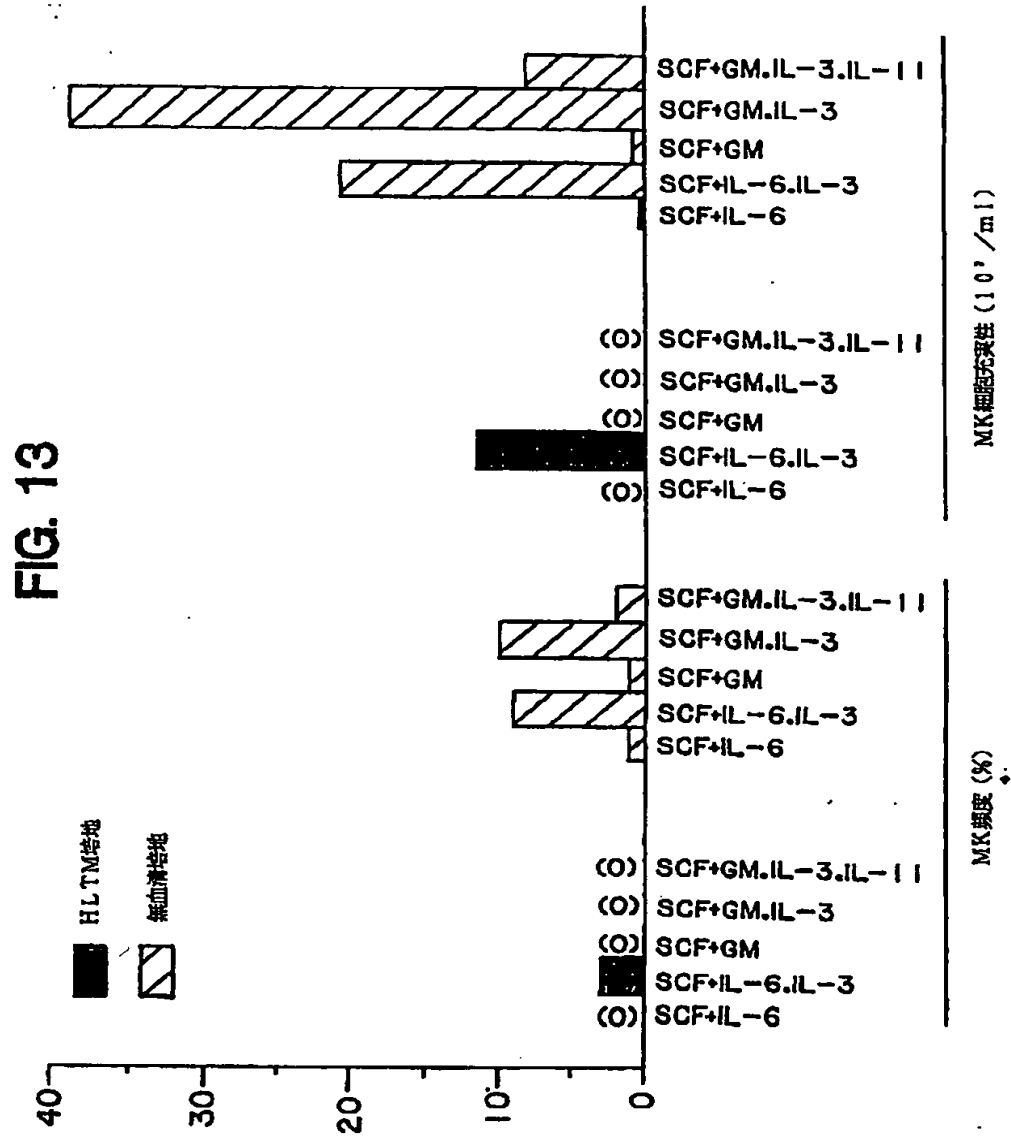


【図 11】

FIG. 11



【图 13】



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/09622

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category   | Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A  | <p>EXPERIMENTAL HEMATOLOGY,<br/>vol.16, no.10, 1988, LAWRENCE, KANS., US<br/>pages 843 - 848<br/>M. TERAMURA ET AL. 'CLONAL GROWTH OF HUMAN<br/>MEGAKARYOCYTE PROGENITORS IN SERUM-FREE<br/>CULTURES: EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN<br/>INTERLEUKIN 3.'<br/>see the whole document<br/>---</p>   | 1-32                  |
| A  | <p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 82<br/>1986, Philadelphia, PA, US;<br/>abstract no. 20424,<br/>K. KUBOTA ET AL. 'MURINE<br/>GRANULOCYTE/MACROPHAGE AND MEGAKARYOCYTE<br/>COLONY FORMATION IN SERUM-FREE CULTURES.'<br/>page AB-94 ;<br/>see abstract<br/>&amp; ACTA HAEMATOL. JPN.,<br/>vol.49, no.1, 1986<br/>pages 27 - 33<br/>-----</p> | 1-32                  |

---

フロントページの続き

- (72) 発明者 キアオ, ジャオイン  
アメリカ合衆国60085イリノイ、ウオーキ  
ーガン、グランドアベニュー ナンバー 4  
1401
- (72) 発明者 マキーカス, スーザン, エム  
アメリカ合衆国94530カリフォルニア、エル  
セリット、エベレットストリート 924
- (72) 発明者 ベンダー, ジェームス, ジー  
アメリカ合衆国60046イリノイ、リンデン  
ハースト、ホワイトパーチロード 565
- (72) 発明者 パン エップス, デニス, イー  
アメリカ合衆国60013イリノイ、ケリー,  
リバードライブ 197
- (72) 発明者 ルドバリス, モーリーン, エフ  
アメリカ合衆国60030イリノイ、グレイス  
レイク、メインセイルドライブ 114

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**